تأثیر جایگزینی Fe-EDTA با Fe-EDDHA ، در استقرار درون شیشه‌ای یوسی‌بی-۱

سیدرضا نظامی[۱]، عباس یداللهی[۲،*]، حسین حکم‌آبادی[۳]، حسین صاحب‌نظر[۱]

۱و۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران. ۳- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی سمنان (شاهرود)، ایران.

*نویسنده مسئول: Yadollah@Modares.ac.ir

چکیده

با توجه به زردی و نکروزه‌شدن انتهایی ریزنمونه‌هایی پایه رویشی UCB-1 در مرحله استقرار، استفاده از آهن سکسترون بجای سولفات‌آهن ضرورت دارد. لذا جهت بهبود استقرار و کنترل زردی از غلظت‌های مختلف (۵۰،۶۰ و ۷۰ میلی‌گرم بر لیتر) آهن سکسترون در محیط کشت تغییر یافته MS استفاده گردید همچنین سولفات آهن در محیط تغییر یافته MS به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد استفاده از ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر آهن سکسترون منجر به بهبود زمان و میزان باززایی و کاهش زردی و سوختگی نسبت به سولفات‌آهن و حتی سایر غلظت‌های آهن سکسترون گردید.

کلمات کلیدی: بهبود استقرار، پایه رویشی UCB-1، FeEDTA ، Fe-EDDHA، MS تغییر یافته

مقدمه

پسته یکی از مهمترین محصولات باغبانی ایران محسوب می‌شود. میزان ارزآوری بالای محصول باعث گردیده که از این محصول به عنوان طلای سبز یاد گردد. استفاده از پایه‌های اصلاح شده، افزایش راندمان آبیاری، بهبود مدیریت باغی و... می‌تواند در افزایش عملکرد تاثیرگذار باشد. لازمه احداث باغات یکدست، تکثیر غیرجنسی می‌باشد. تکثیر پسته از طریق قلمه بسیار دشوار و حتی غیرممکن بوده و صرفه اقتصادی ندارد لذا استفاده از تکثیر درون‌شیشه‌ای می‌تواند یک روش مطمئن و انبوه برای پسته باشد. کشت دون‌شیشه‌ای پسته همواره به خاطر ترشح فنل، زردی وسوختگی انتهایی در مرحله استقرار و پرآوری و سخت ریشه‌زا بودن با دشواری‌ها و محدودیت‌هایی روبرو بوده است. راهکارهای زیادی به منظور کنترل فنل ارائه گردیده است. استفاده از آنتی-اکسیدان‌ها، غوطه‌وری درون آب مقطر دوبار استریل بعد ازاستریل کردن، غوطه‌وری درون محلول آنتی اکسیدان به صورت قبل و بعد از استریل کردن (Nezami et al., 2015c) استفاده از ترکیبات جذب کننده ترکیبات فنلی مانند زغال فعال (Jafarkhani et al., 2009) و پلی‌وینیل‌پایریلیدون، تغییر غلظت عناصر محیط کشت پایه (Nezami, et al., 2015a)، کاهش غلظت ساکارز، استفاده از آب جاری(Zamir et al., 2007; Bon et al., 1988)، تاریک‌دهی واتیوله کردن نهال مادری(Nezami, et al., 2015b) ، تلقیح گیاه مادری با قارچ مایکوریزا به منظور کاهش تنش (Krishna, and Singh, 2008) ودرنهایت قرار دادن ریزنمونه کشت شده در محیط تاریک و یا با دمای پایین از اقدامات کنترل تولید و ترشح ترکیبات فنلی می‌باشد. ترشح ترکیبات فنلی منجر به بسته شدن مسیرآوندها و کاهش جذب عناصر غذایی و د نهایت منجر به زردی و سوختگی می‌گردد. همچنین گاهی حتی بعد از رفع مشکل فنل، مشکل زردی در مرحله استقرار وجود دارد که بیشتر به خاطر کمبود آهن حادث می‌گردد (داده‌ها نشان داده نشده). استفاده از آهن قرمز به خاطر ثبات بالایی که دارد می‌تواند جایگزین مناسبی برای منبع آهن باشد. همچنین استفاده از آهن قرمز به خاطر ثبات و جذب بالاتر می‌تواند در افزایش سرعت بازشدن و باززایی تاثیر داشته باشد.

مواد وروش‌ها

ریزنمونه‌های تک‌گره از نهال‌های دوساله پایه رویشی یوسی‌بی-۱ رشد کرده در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی تربیت مدرس تهیه گردیده و جهت ضدعفونی به آزمایشگاه ریزازدیادی منتقل گردیدند. جهت رفع آلودگیهای قارچی و باکتریایی از روش توصیف شده توسط نظامی وهمکاران (۱۳۹۴) استفاده گردید. در ادامه جهت رفع مشکل فنل، ریزنمونه‌ها به مدت ۱۲۰ دقیقه درون غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم برلیتر آسکوربیک اسید غوطه ور شدند و سپس درون محیط کشت تغییریافته MS به همراه ویتامین‌های گمبورگ، ۳٪ ساکارز و ۶/۲ گرم برلیتر آگارز کشت گردیدند.

به منظور بهبود استقرار و رفع زردی ریزنمونه‌های باززایی کرده، از غلظت‌های مختلف (۵۰، ۶۰ و ۷۰ میلی‌گرم برلیتر) آهن سکسترون به‌جای سولفات آهن در محیط کشت تغییر یافته MS استفاده شد. همچنین از محیط کشت تغییریافته MS همراه با سولفات آهن به عنوان محیط کشت شاهد استفاده گردید. در پایان میزان ریزنمونه‌های فاقد فنل، میزان باززایی، مدت زمان لازم برای باززاییی و زردی ریزنمونه‌های باززایی کرده یادداشت گردید.

جدول تجزیه واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف آهن سکسترون و سولفات آهن بر کنترل فنل و استقرار ریزنمونه‌های پایه رویشی یوسی‌بی-۱

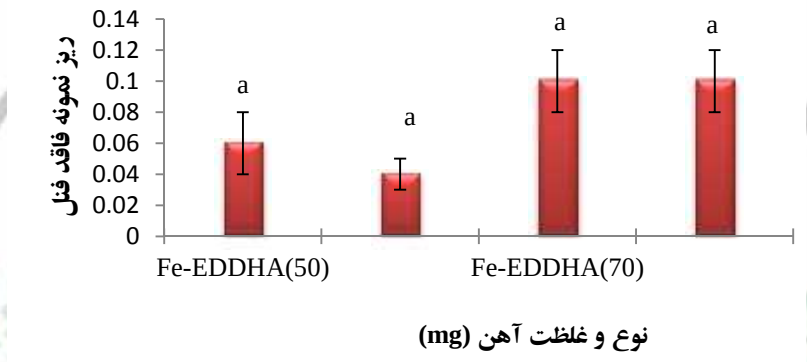
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		فاقد فنل	باززایی کرده	زمان باززایی
نوع منبع آهن	۳	۰/۰۰۹ ns	۰/۰۱ ns	۵۹/۰۶**
خطا	۲۳	۰/۰۰۹	۰/۰۰	۲/۴۰

نتایج

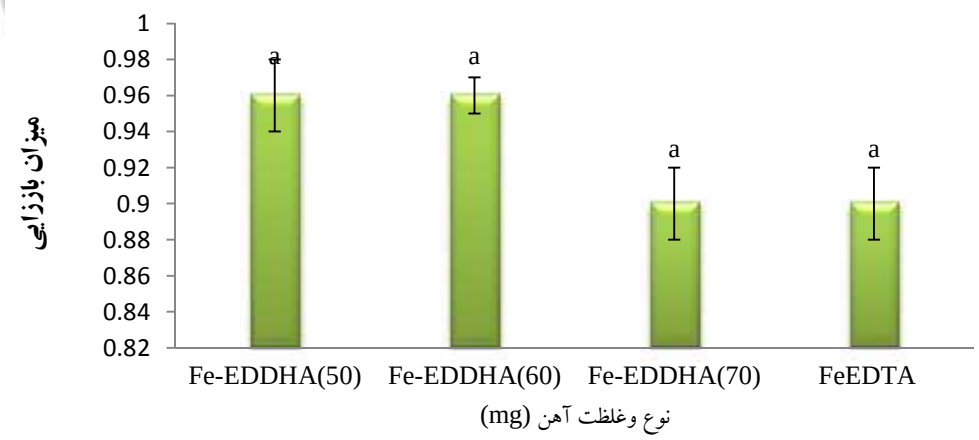
نتایج آزمایش‌ها نشان داد که تاثیر غلظت‌های مختلف آهن سکسترون با سولفات آهن بر میزان ترشح فنل معنی‌دار نگردید ولی در زمان باززایی تاثیر معنی‌داری در سطح آماری یک درصد مشاهده گردید به طوریکه نتایج حاکی ازآن بود که بین غلظت‌های مختلف و همچنین محیط کشت شاهد (سولفات آهن) اختلاف معنی‌دار وجود دارد. استفاده از آهن قرمز به‌جای آهن اگرچه منجر به بهبود کنترل فنل و باززایی گردید ولی تاثیر آماری معنی‌داری ایجاد نکرد. استفاده از آهن سکسترون منجر به افزایش سرعت جوانه‌زنی و رشد نوساقه‌های باززایی کرده گردید و باعث شد که تک‌گره‌ها زود از محیط دارای سولفات‌آهن باززایی کنند. همچنین بین غلظت‌های مختلف آهن سکسترون نیز تفاوت معنی‌دار وجود داشت به‌طوریکه استفاده از ۶۰ میلی‌گرم برلیتر آهن سکسترون منجر بهترین زمان باززایی (۸ روز بعد از استقرار) را نشان داد و دیرترین زمان باززیی (۱۳ روز بعد از استقرار) مربوط به محیط کشت دارای سولفات‌آهن (شاهد) بود. همچنین ریزنمونه‌های باززایی کرده در محیط کشت دارای آهن قرمز میزان زردی کمتری داشتند و ریزنمونه‌های باززایی کرده شادابی بیشتری نسبت به ریزنمونه‌هامحیط کشت دارای سولفات آهن داشتند. کنترل زردی در مرحله استقرار منجر به بهبود وضعیت کیفی و شادابی جوانه‌های باززایی کرده می‌شود. همچنین می‌تواند متنجر به قوی‌تر شدن نوساقه‌های باززایی کرده شود که این امر منجر به افزایش میزان پرآوری در مراحل بعدی گردد. زردی حاصل از مرحله استقرار در اثر کمبود عناصری چون آهن صورت می‌گیرد. آهن استفاده‌شده در محیط کشت موراشیک و اسکوگ به فرم FeEDTA هست که پایدار نیست و آهن آزادشده به‌سرعت به فرم غیرقابل‌دسترس برای گیاه تبدیل می‌شود(Antonopoulou et al., 2007). آهن یکی از عناصر ریزمغذی گیاهی ضروری می‌باشد، که نقش کلیدی در واکنش‌های متابولیکی سلول‌های گیاهی مخصوصا بیوسنتز کلروفیل دارد. بنابراین کمبود آن به شدت سبب محدودیت رشد و توسعه گیاه می‌گردد. بسیاری از مسیرهای متابولیکی متکی بر آنزیم‌های روکس آهن شامل زنجیره انتقال الکترون فتوسنتز و تنفس (ترکیبات پورفین از قبیل پریدوکسین و سیتوکروم)، بیوسنتز DNA (ریبونوکلئوتیدردوکتاز)، لیپیدها (لیپوکسی ژناز)، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از قبیل اکسین و اتیلن (۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید اکسیداز)، سمیت زدایی گونه‌های اکسیژن فعال (کاتالاز و سوپر اکسید دسموتاز) و

تثبیت نیتروژن (نیتریت و نیترات ردکتاز) نیازمند آهن می باشند(Curi et al., 2009). آهن برای فعال سازی پراکسیداز که واسطه کاتابولیسم ایندول-۳- استیک اسید ضروری می‌باشد در محیط کشت MS (موراشینگ و اسکوگ ۱۹۶۲) آهن به فرم FeEDTA به کار برده شده است. این فرم آهن پایدار نیست و آهن آزاد شده به سرعت غیر قابل دسترس برای بافت گیاهی می گردد.کمبود یا تغییر PH محیط کشت منجر به کاهش در دسترس بود آن، جلوگیری از رشد شاخه‌ها و کاهش سنتز رنگدانه‌های کلروپلاست می‌گردد(Lombardi et al., 2003).به عبارت دیگر جایگزینی FeEDTA با مقدار معادل(مشابه) FeEDDHA اثرات مثبتی در ریزافزایی و کاهش کلروز گونه‌های مختلف گیاهی داشته است. قابلیت فسفاته شدن FeEDDHA در رنج وسیعی از PH به علت پتانسیل پایین اکسیداسیون از FeEDTA بالاتر است(Gomez, 2005).

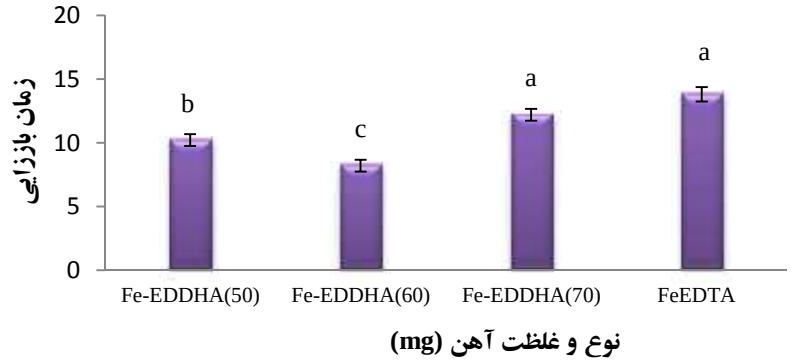
بنابراین ما برای افزایش میزان جذب و افزایش پایداری در محیط کشت بهتر است از فرم آهن Fe-EDDHA به جای Fe EDTA استفاده شود (Molassiotis et al., 2003). نتایج نشان داد که استفاده از آهن قرمز منجر به بهبود استقرار و کاهش زردی و همچنین افزایش سرعت باززایی جوانه‌های باززایی شده گردید که احتمالا به خاطر ثبات بالا در محیط کشت می‌باشد.



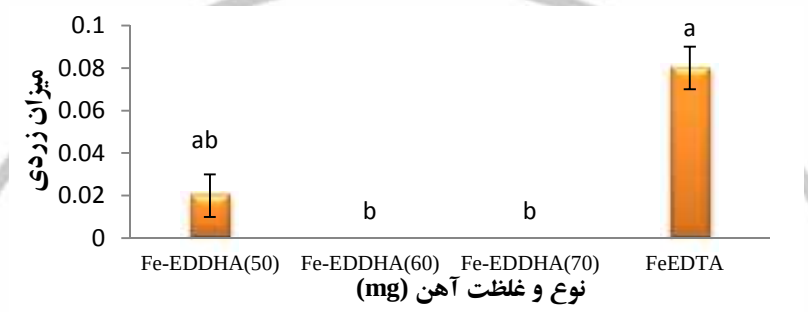
نمودار۱- تاثیر نوع وغلظت‌های مختلف آهن بر کنترل فنل ریزنمونه‌های پایه رویشی UCB-1



نمودار ۲- تاثیر نوع وغلظت‌های مختلف آهن بر میزان باززایی ریزنمونه‌های پایه رویشی UCB-1



نمودار ۳- تاثیر نوع وغلظت‌های مختلف آهن بر زمان باززایی ریزنمونه‌های پایه رویشی UCB-1



نمودار ۴- تاثیر نوع وغلظت‌های مختلف آهن بر میزان زردی و سوختگی ریزنمونه‌های پایه رویشی UCB-1

منابع

1. Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I. and Chatzissavvidis, C. (2004). The influence of radiation quality on the in vitro rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. Biologia plantarum, 48: 549-553.
2. Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I. and Chatzissavvidis, C. (2004). The influence of radiation quality on the in vitro rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. Biologia plantarum, 48: 549-553.
3. Bon, M.C., M. Gendraud and A. Franclet, 1988. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and mature clones of Sequoiadendron giganteum: Influence of activated charcoal. Scientia Horticulturae, 34: 283-291.546,
4. Gomez, E.A ; De Laia, M.L., Esbrisse, E.J. and De Araujo, E.F. (2000). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of genotypic identities in Eucalyptus clones. Silvae Genet. 49: 239–243.
5. Jafarkhani, K.M., Z.S. Hosseini and A.A. Habashi (2009) A refined tissue culture medium for In vitro proliferation of apple rootstocks. Acta Horticulture. 829: 313-318.
6. Krishna, H., and Singh, S. K (2008). Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. Scientia horticulturae, 118(2), 132-138.
7. Molassiotis, A., Dimassi, K., Therios, I. and Diamantidis, G. (2003). FeEDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (Prunus amygdalus× P. persica) explants in vitro. Biologia plantarum, 47: 141-144.
8. Molassiotis, A., Dimassi, K., Diamantidis, G. and Therios, I. (2004). Changes in peroxidases and catalase activity during in vitro rooting. Biologia plantarum, 48: 1-5.
9. Nezami S.R., A. Yadollahi, H. Hokmabadi, 2015a, Effects of Treatment of stock plant in dark condition on in vitroEstablishment of UCB1 (Hybrid of Pistacia integrima× P. atlantica) Rootstock, First International and 9th National Biotechnology Congress
10. Nezami S.R., A. Yadollahi, H. Hokmabadi, 2015b, Control of Phenolic exudation and Improvement establishment of Pistachio explants whit Apical bud in In vitro condition, First International and 9th National Biotechnology Congress, Tehran, Iran
11. Zamir, R., N. Ali, S.T. Shah, T. Muhammad and S.A. Shah, 2007. in vitro Re-generation of guava (Psidiuna guajava L.) from shoot tips of mature trees. Pakistan Journal of botany, 39(7): 2395-2398.

The effect of Fe-EDTA replacement with Fe-EDDHA on the in vitro establishment of UCB-1

S. R. Nezami[1], A. Yadollahi[2]*, H. Hokmabadi[3], H. Saheb-Nazar[1]

1- MS_c student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran. 2-Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran. 3- Scientific Member of Semnan (Shahrood) Agricultural Research Center, Iran.

*Corresponding author: Yadollah@Modares.ac.ir

Abstract

Considering the apical chlorosis and necrosis of UCB-1 vegetative rootstock explants in establishment phase, using Fe-sequestron instead of FeSO4 will be critical. So, we used different concentrations (50, 60 and 70 mg/l) of Fe-Sequestron in Murashige and Skoog (MS) medium as well as FeSO4 in modified MS (mMS) medium as control. Results showed that 60 mg/l Fe-Sequestron resulted in improved time and regeneration rate and decreasing chlorosis and necrosis to FeSO4 and even the rest of Fe-Sequestron concentrations.

Key word: Establishment, UCB-1, FeEDTA ، Fe-EDDHA ،modified MS